

JP9263543

Publication Title:

PEPTIDIC DIFFERENTIATION PROMOTER

Abstract:

Abstract of JP9263543

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a peptidic differentiation promoter for an oligodendrocyte comprising a peptide as an active ingredient and useful for preventing and treating myelination disorder and demyelination diseases.

SOLUTION: This peptidic differentiation promoter comprises a peptide composed of all or a part of an amino acid sequence represented by amino acid Nos. 151-276 in an amino acid sequence represented by the formula (with the proviso that the amino acid sequence represented by amino acid Nos. 215-232 is included) as an active ingredient. The peptide is obtained by repeating, e.g. deprotecting an α -amino group on the solid phase, activation and coupling of the protected amino group and finally deprotecting the side chain and cleaving the peptide from the solid-phase support. The myelination insufficiency and demyelination cause dyskinesia or a behavioral abnormality and the promoter is useful for preventing and treating congenital liquid dysbolism, phenylketonuria, cretinism, multiple sclerosis, acute diffuse cerebromeningitis, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-263543

(43)公開日 平成9年(1997)10月7日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADS		A 6 1 K 37/02	ADS
	AAA		C 0 7 K 14/47	Z NA
	AAB		A 6 1 K 37/02	AAA
	AAM			AAB
	ABA			AAM

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-76064	(71)出願人	596043553 池中 一裕 愛知県岡崎市牧御堂町字花辺11-8
(22)出願日	平成8年(1996)3月29日	(72)発明者	池中 一裕 愛知県岡崎市牧御堂町字花辺11-8

(54)【発明の名称】 ペプチド性分化促進剤

(57)【要約】

【解決手段】 PLPおよびDM-20のオリゴデンドロサイト分化促進活性部位を有するペプチド、特に少なくともPLPの215~232位のアミノ酸配列を有する、PLPの151~276位のアミノ酸配列の全部または一部からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイト分化促進剤。

【効果】 本発明の分化促進剤はミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号151乃至276で表されるアミノ酸配列の全部または一部（但し、アミノ酸番号215乃至232で示されるアミノ酸配列を含む）からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項2】 実質的に、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号215乃至276で表されるアミノ酸配列の全部または一部（但し、アミノ酸番号215乃至232で示されるアミノ酸配列を含む）からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項3】 実質的に、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号215乃至232で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤。

【請求項4】 ミエリン形成障害性疾患または脱髓性疾患の治療剤である請求項1～3のいずれかに記載の分化促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はミエリンプロテオリピド蛋白質（myelin proteolipid protein；以下、PLPと略称する）遺伝子の翻訳産物の部分アミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイト〔oligodendrocyte（希突起膠細胞）；以下、ODCと略称する場合もある〕の分化促進剤に関する。また、本発明はミエリン形成障害性疾患、脱髓性疾患等の予防および治療剤である上記分化促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】脳神経系には多種多様な細胞が存在し、複雑且つ整然とした構造を構築している。脳組織は大別すると神経細胞（ニューロン）とそれを補助する神経膠（グリア）細胞とで構成されている。グリア細胞には、神経細胞への栄養補給、神経伝達物質の代謝等を行うアストロサイト（星状膠細胞）、中枢ミエリン鞘形成を担うオリゴデンドロサイト等がある。これら多様な脳細胞の大半は脳室壁付近で分裂する神経上皮細胞より分化したものである。

【0003】中枢神経系では、オリゴデンドロサイトが突起を伸長させ、神経軸索の周りを何重にも巻いて包んでおり、その細胞膜（細胞質はほとんどなくなっている）が層状に重なってミエリン（髓鞘）を形成している。ミエリンは軸索を電気的に絶縁し、情報伝達速度を増すなどの役割を果たしている。中枢神経系ミエリンには、ミエリン塩基性蛋白質（myelin basic protein；MBP）とPLP（ヒトPLPの膜貫通モデルを図1に、全アミノ酸配列を配列表配列番号1に示す）の2つの主要構成蛋白質があり、これらはミエリン形成期に同調し

て発現が増大することが知られている。

【0004】ミエリン形成不全や脱髓（demyelination）が起こると、ニューロンの機能が発揮できず重度の神経障害を引き起こす。かかるミエリン形成障害性或いは脱髓性疾患の治療方法として、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの分化・増殖を促進し、ミエリン再形成（remyelination）を誘発する方法が注目されており、血小板由来増殖因子（PDGF）、インシュリン様増殖因子I（IGF-I）、神経栄養因子3（NT-3）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）等幾つかのペプチド性細胞外シグナル分子にオリゴデンドロサイトの分化促進作用があることが既に報告されている。

【0005】一方、本発明者は以前、PLP遺伝子の選択的スプライシング産物であり、PLPの116～150位のアミノ酸残基が欠失した（即ち、PLP構造遺伝子の第3エクソンの一部がスプライシングを受け、35個のアミノ酸を欠失した）蛋白質DM-20がオリゴデンドロサイト発生・分化前のマウス胎仔脳内で選択的に発現していることを見出した（Ikenaka et al., J. Neurochem., 58: 2248-2253, 1992）。さらに、DM-20またはPLPのcDNAを含む発現ベクターで形質転換された細胞（NIH-3T3）の培養上清の添加がオリゴデンドロサイトの分化を促進することを明らかにした（特開平6-211683号公報）。しかしながら、これらはいずれも未精製の培養上清を使用していたために、当該培養上清中に含まれるオリゴデンドロサイト分化促進因子がDM-20またはPLPそのものであるのか、或いはそれらの発現が他の分化促進因子の分泌を促進するのかについては未解明のままであった。

【0006】さらに、本発明者は精製したPLPまたは部分精製したDM-20を初代脳細胞培養系に添加して、PLPおよびDM-20そのものがオリゴデンドロサイトの分化促進作用を有することを見出した〔国際神経化学会（1995年）で発表〕。しかしながら、PLPおよびDM-20は自己免疫疾患である実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）を惹起することが知られているため、PLPやDM-20そのものを含む製剤は医薬用途には適さない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、PLPおよびDM-20のオリゴデンドロサイト分化促進活性部位を特定し、当該部位のアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイト分化促進剤を提供することである（低分子量ペプチドであれば免疫原性を有しないことが期待される）。また、本発明はミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療剤である上記分化促進剤の提供を目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成すべくPLPおよびDM-20の部分アミノ酸配列

からなる種々の合成オリゴペプチドをそれぞれ初代脳細胞培養系に添加し、それらのオリゴデンドロサイト分化促進活性を調べた結果、PLPの215～232位(DM-20の180～197位)の18アミノ酸残基からなるペプチドがオリゴデンドロサイトの分化を著しく促進することを見出した。

【0009】即ち、本発明は、実質的にPLPの151位～276位のアミノ酸配列の全部または一部（但し、215位～232位のアミノ酸配列を含む）、好ましくは215位～276位のアミノ酸配列の全部または一部（但し、215位～232位のアミノ酸配列を含む）、就中215位～232位のアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするオリゴデンドロサイトの分化促進剤である。また、本発明はミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療剤である上記分化促進剤である。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のオリゴデンドロサイト分化促進剤の有効成分であるペプチド（以下、ODC分化促進活性ペプチドという場合もある）は、実質的にPLP蛋白質の151位～276位のアミノ酸配列の全部または一部（但し、少なくとも実質的に215位～232位のアミノ酸配列を含む）からなるものであれば特に限定されず、オリゴデンドロサイト分化促進活性を有する限りアミノ酸配列の一部が欠失、置換または修飾されていても、或いは内部もしくはC末端に他のアミノ酸が付加されていてもよい。好ましくは実質的にPLPの215位～276位のアミノ酸配列の全部または一部（但し、少なくとも実質的に215位～232位のアミノ酸配列を含む）からなるペプチド、より好ましくは実質的にPLPの215位～232位のアミノ酸配列からなるペプチドである。ODC分化促進活性ペプチドの同定については、後記参考例1および試験例1において詳述する。

【0011】上記のペプチドは自体公知のいかなる方法によって製造されてもよく、例えばPLPまたはDM-20蛋白質を化学的および/または酵素的に処理して目的のペプチド断片を得る方法、化学的に合成する方法、PLPまたはDM-20のcDNAから切り出した目的のペプチドをコードする領域を機能的に含有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養してその培養物から目的のペプチドを回収する方法等が挙げられる。PLPまたはDM-20蛋白質はそれを大量に発現する細胞、例えばオリゴデンドログリオーマ系株化細胞であるG26細胞やPLPまたはDM-20のDNAを含む組換えベクターで形質転換した宿主細胞の培養物から透析、ゲル沪過、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動等の任意慣用の方法によって抽出精製することができる。

【0012】本発明のペプチドは、アミノ酸配列が公知

で且つ比較的短いペプチドであることから化学合成により製造することが好ましい。ペプチドの化学合成は、カルボキシル基を保護したアミノ酸にアミノ基を保護したアミノ酸を縮合させた後保護基を除去することにより行われる。この際遊離のアミノ基に次の保護アミノ酸を順次結合させる逐次延長法と、オリゴペプチド間のカップリングにより大きく延長させる断片縮合とがあり、後者は数十残基以上の長鎖ペプチド合成に適している。また、不溶性の高分子担体上でペプチド鎖をC末端から伸長させる固相法と担体を用いない液相法があり、固相法は自動化されている。ペプチド合成機による自動ペプチド合成は固相法および逐次延長法を採用している。即ち、固相上のαアミノ基の脱保護、保護アミノ酸の活性化、カップリング（ペプチド結合）を繰り返して最後に側鎖の脱保護およびペプチドの固相担体からの切断を行って目的のペプチドを得ることができる。側鎖の脱保護以降は手動で行われる。固相担体としては、ジビニルベンゼンで架橋したポリスチレンビーズ、ポリアミド等が用いられる。αアミノ基の保護基としてはt-ブチルオキシカルボニル基(t-Boc)、フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)等が使用される。また、精製は逆相HPLC等によって行うことができる。

【0013】本発明のODC分化促進剤は、例えば成熟脳内のODC前駆細胞を活性化してODCの分化・増殖を促進し、ミエリン再形成をもたらすことから、ひいてはミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療剤として有用である。

【0014】ミエリン形成不全および脱髓は、運動障害や行動異常の原因となる。また、先天性脂質代謝異常症、フェニルケトン尿症、クレチニ病、多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎等がミエリン形成障害性および脱髓性疾患として挙げられる。

【0015】本発明のODC分化促進剤（ミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療剤）は、上述のODC分化促進活性ペプチドと医薬上許容される担体とを混合することにより製造することができる。医薬上許容される担体としては、固体製剤において、賦形剤（例えば乳糖、トウモロコシ澱粉、マンニトール、結晶セルロース等）、潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、コロイドシリカ等）、結合剤（シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、トラガントガム、ポリビニルピロリドン等）、崩壊剤（例えば、馬鈴薯澱粉、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、キチン、キトサン等）などが、また液状製剤において、非水性ヒヒクル（例えば、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン等のアルコール類、オリーブ油、アーモンド油、ゴマ油、綿実油、ヒマシ油、トウモロコシ油等の油脂類、油性エステルなど）、溶解補助剤（例えば、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン、カフェイン、

・ポリエチレングリコール等)、懸濁化剤(例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリソルベート80等の界面活性剤、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、ソルビットシロップ等の親水性高分子など)、増粘剤(例えば、卵黄レシチン、ゼラチン、アラビアゴム、トラガントガム、メチルセルロース、ベクチン等)、等強化剤(例えば、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、グルコース、塩化ナトリウム等)、乳化剤(例えば、レシチン、モノオレイン酸ソルビタン等)、緩衝剤(例えば、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、酢酸緩衝剤等)、無痛化剤(例えば、ベンジルアルコール等)などが適宜配合される。また、必要に応じて保存剤(例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール等)、キレート剤(例えば、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、締合リン酸ナトリウム等)、抗酸化剤(例えば、亜硝酸塩、アスコルビン酸、システィン等)、着色剤(例えば、タル色素、カンゾウエキス、リボフラビン等)、甘味剤(グルコース、シュークロース、サッカリン等)、着香剤(例えば、バニリン、メントール等)、芳香剤(例えば、ウイキョウ油、メントール等)などを常法に従って添加してもよい。

【0016】上記以外に、寒天、カゼイン、コラーゲン等が医薬上許容される担体として例示される。

【0017】経口用固体製剤としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等が例示される。例えば錠剤は、ODC分化促進活性ペプチドに上記賦形剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤等を適宜添加して圧縮成形することにより製造される。また、所望により、圧縮成形後に上記甘味剤、着香剤、芳香剤等をさらに添加してもよいし、腸溶性および/または安定化を図るために、自体公知のコーティング剤(例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースフタレート、オイドラギット等の合成または半合成物質、シェラック等の天然物、メタアクリル酸とアクリル酸エチルエステルとの共重合体およびメタアクリル酸とメタアクリル酸メチルエステルとの共重合体の混合物など)を用いてコーティングを行うこともできる。

〔配合処方〕

ODC分化促進活性ペプチド〔PLP ₂₁₅₋₂₃₂ ¹⁾ 〕	10mg
リン酸緩衝生理食塩水(PBS)	10mL

1) PLPの215-232位のアミノ酸配列からなる。

〔調整方法〕ペプチド合成機(アプライド431A;アプライドバイオシステムズ社製)を用い、常法に従ってPLP₂₁₅₋₂₃₂を合成および精製した。当該ペプチドをPBS中に加え、4°Cにて一晩穏やかに振盪した後必要に応じて適当なpH調整剤を加え、0.45μmのフィルター(ミリポア社製)で沪過滅菌して-80°Cにて保

【0018】経口用液体製剤としては、水性または油性懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤等が例示される。例えば懸濁液剤はODC分化促進活性ペプチドを上記溶剤中に懸濁させることにより製造することができる。また、所望により上記懸濁化剤を適宜添加して用いてもよい。さらに、経口用製剤は用時適当なビヒクルに溶解または懸濁させる固体製剤であってもよい。

【0019】非経口用の製剤としては、例えば注射剤等が挙げられる。注射剤としては、静脈内注射剤、動脈内注射剤、皮下注射剤、筋肉内注射剤等が例示される。注射剤は水性または非水性のいずれでもよく、また、溶液でも懸濁液であってもよい。好ましくは、用時注射用滅菌精製水等の適当なビヒクルに溶解させる凍結乾燥製剤等が用いられる。

【0020】注射剤は、例えばODC分化促進活性ペプチドを保存剤(例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール等)、等強化剤(例えば、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、グルコース、塩化ナトリウム等)等とともに注射用滅菌精製水に溶解させることにより水性注射剤として、または非水性ビヒクル(例えば、エタノール、プロピレンジコール、グリセリン等のアルコール類、オリーブ油、アーモンド油、ゴマ油、綿実油、ヒマシ油、トウモロコシ油等の油脂類、油性エステルなど)に溶解もしくは懸濁させることにより非水性注射剤として製造することができる。また、必要に応じて緩衝剤、安定化剤、pH調製剤等を適宜添加してもよい。

【0021】本発明のODC分化促進剤(ミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療剤)の投与量は患者の症状、年齢、体重等によって異なるが、ODC分化促進活性ペプチドの投与量として、通常成人1日あたり1ng~10mg、好ましくは10ng~1μg程度である。これを1回または分割して投与することができる。

【0022】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより明確に説明し、試験例により本発明の効果を明らかにするが、これらは単なる例示であって、これらにより本発明の範囲が限定されるものではない。

【0023】実施例1 製剤例

存した。

【0024】参考例1 PLPの部分アミノ酸配列に特異的な抗体による精製PLPおよびPLP発現NIH-3T3細胞培養上清のODC分化促進活性の抑制

(1) PLPの精製

ddY系マウス小脳に1% Triton X-100を

・含む抽出バッファーを加えてホモジナイズし、当該ホモジネートを $1,000\times g$ で5分間遠心分離して上清を分取した。該上清をさらに $100,000\times g$ で60分間超遠心分離し、P2/P3膜画分(沈澱)を得た。これを1% Triton X-100にて可溶化し、 $27,000\times g$ で60分間超遠心分離して上清を分取した。該上清をDE-52カラムに付し、 $0\sim0.3M$ のNaClグラジエントで溶出して溶出画分を採取し、これをさらにヘパリンーアガロースカラムに通し、 $0.25\sim1.0M$ のNaClグラジエントで溶出して溶出画分を回収した。該画分をさらにCM-52次いでSephadryl S-300カラムに付すことにより溶出画分に精製PLPが得られた。精製PLPは上記製剤例に従って製剤化し、下記ODC分化誘導に供した。

【0025】(2) PLP発現NIH-3T3細胞培養上清の調製

マウス小脳由来PLP cDNAの蛋白質コード領域を機能的に含有するレトロウイルスベクターをパッケージングして得られるウイルス粒子(pDL⁺PLP)を、NIH-3T3細胞に感染させて作製したPLP発現形質転換細胞(特開平6-211683号公報)をN4合成功培地($5\mu g/mL$ インスリン、 $1\mu g/mL$ トランスフェリン、 $20nM$ プロゲステロン、 $100\mu M$ ブトレシンを含むダルベッコ最少必須培地:ハムF12培地=1:1(DMEM/Ham's F12)]の中で1~2日間培養し、培養上清を回収した。該培養上清をアミコン(YM-10)濃縮機で1/10容量に限外沪過した後、 $5mM$ リン酸緩衝液、 $50mM$ NaCl、 $1\mu g/mL$ PMSFで透析して濃縮試料とした。

【0026】(3) 初代脳細胞培養

ICR系妊娠マウスをエーテル麻酔後、下腹部を切開し、腹腔から子宮を取り出した後、PBS(-)中で該子宮を切開して胎仔を取り出し、頭部の皮膚、頭蓋骨を切開して脳を取り出した後実体顕微鏡下におき、大脳半球を取り出し、髄膜や血管を取り除いた後3~4等分してPBSごと遠心チューブに移した。2.5%トリプシン、5%グルコースを含むPBS(-)1mLと1%DNAse水溶液 $100\mu L$ を加えて全量 $10mL$ とし、恒温振とう機で $250 rpm$ 、 $37^\circ C$ で20分間振盪した。ウマ血清 $5mL$ を加え、低速遠心機で $800 rpm$ 、3分間遠心し、沈澱に10%ウシ胎児血清(FBS)を含むDMEM/Ham's F-12を $10mL$ 程度加えた。ビベッティングにより大きな塊を分散させた後さらに10%FBSを含むDMEM/Ham's F-12を $10mL$ 程度加えた。静置した後上清を採取し、血球計算盤で細胞数を数えて適量の培養液に懸濁し、ボリエチレンイミン(PEI)コーティングしたディッシュにプレーティングした。

【0027】(4) オリゴデンドロサイトの分化誘導
上記(3)で調製した初代脳細胞培養を2日間培養した

後、培養液を除き洗浄後完全合成培地[2:1 O3 ($10\mu g/mL$ インスリン、 $1\mu g/mL$ トランスフェリン、 $10ng/mL$ ビオチン、 $30nM$ セレナイトを含むDMEM):N4]に交換し、これをまず2群(Sup群、PLP群)に分け、Sup群には上記(2)で調製した培養上清濃縮試料を、PLP群には上記(1)で調製した精製PLP液剤をそれぞれ加えた。また、各群についてさらにPLPの209~217位のアミノ酸配列(PLP₂₀₉₋₂₁₇)に対する抗体または264~276位のアミノ酸配列(PLP₂₆₄₋₂₇₆)に対する抗体をそれぞれ加えた試料を作製し、これらを10日間培養した。

【0028】(5) オリゴデンドロサイト分化の確認
上記(4)の各培養について、培地を10%FBSを含むDMEMに交換して1時間培養した後O1モノクローナル抗体(オリゴデンドロサイトの細胞表面抗原(ガラクトセレブロシド)を特異的に認識するモノクローナル抗体; Sommer and Schachner, Dev. Biol., 83: 311-327 (1981))産生ハイブリドーマの培養上清に交換し、室温で30分間静置し、PBS(-)で2回洗浄した。4%パラホルムアルデヒドで15分間固定後、PBS(-)で3回洗浄し、ブロッキング液($500\mu g/mL$ ウシ血清アルブミン、1%FBSを含むPBS(-))を加えて一晩静置した。PBS(-)で3回洗浄後、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識二次抗体を加えて $37^\circ C$ で30分間静置し、PBS(-)で3回洗浄した後蛍光顕微鏡で染色細胞を計数した。その結果、培養上清、精製PLPともオリゴデンドロサイトの分化を促進したが、PLP群のODC分化促進活性が抗PLP₂₀₉₋₂₁₇抗体および抗PLP₂₆₄₋₂₇₆抗体の両方で対照群レベルに抑制されるのに対し、Sup群では、ODC分化促進活性は抗PLP₂₆₄₋₂₇₆抗体では抑制されるが、抗PLP₂₀₉₋₂₁₇抗体では抑制されなかった。このことから、培養上清中のODC分化促進活性因子はPLP₂₆₄₋₂₇₆を有するがPLP₂₀₉₋₂₁₇を有しない物質であることが示され、また、PLPの200位ぐらいからC末端の間にODC分化促進活性部位が存在することが強く示唆された。

【0029】試験例1 PLPの部分アミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドを用いたODC分化促進活性部位のスクリーニング
上記製剤例の方法に従って、PLP₄₀₋₅₀(PLPの40~50位のアミノ酸配列)、PLP₂₀₉₋₂₁₇、PLP₂₁₅₋₂₃₂[以上、 $1mg/1mL$ PBS(-)]およびPLP₂₆₄₋₂₇₆[$1mg/1mL$ PBS(-)+酢酸数滴]液剤をそれぞれ調製した。これらを種々の濃度になるように上記参考例1の(4)および(5)の方法に従って初代脳細胞培養に添加してODC分化促進活性を調べた。その結果、PLP₂₁₅₋₂₃₂のみがODC分化促進活性を有し、該活性は濃度依存的に上昇した(図

2)。また、精製PLPのODC分化促進活性が10ng/Lで最大に達し、それ以上では減少するのに対し、PLP₂₁₅₋₂₃₂のODC分化促進活性は10ng/L以上でもさらに上昇し、10mg/Lでプラトーに達した。

[0030]

【発明の効果】本発明の分化促進剤の有効成分であるペプチドは、オリゴデンドロサイトの分化を促進し、ミエリン再形成を促すので、ミエリン形成障害性および脱髓性疾患の予防および治療剤として非常に有用である。特にPLP₂₁₅₋₂₃₂は、少なくともある種のマウスにおいてEAEを惹起しないことが報告されており、免疫原性

配列：

Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe Ala
 5 10 15
 Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe Cys
 20 25 30
 Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr
 35 40 45
 Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val Ile
 50 55 60
 His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Leu
 65 70 75 80
 Tyr Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala Val
 85 90 95
 Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu
 100 105 110
 Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln
 115 120 125
 His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp
 130 135 140
 Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val
 145 150 155 160
 Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr
 165 170 175
 Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr
 180 185 190
 Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val
 195 200 205
 Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu
 210 215 220
 Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile
 225 230 235 240
 Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe
 245 250 255
 Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg
 260 265 270
 Gly Thr Lys Phe
 275 276

が弱いことが示唆される。また、本発明の分化促進剤は、オリゴデンドロサイト前駆細胞上に存在すると考えられる受容体のスクリーニング、セカンドメッセンジャーの探索等のオリゴデンドロサイト分化機構の解明に有効な研究方法を提供するものである。

〔0031〕

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ : 276

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

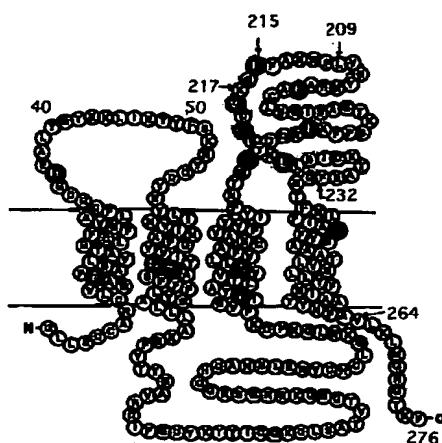
【図1】ミエリンプロテオリピド蛋白質の膜貫通モデル

を表す図である。丸内のアルファベットは構成アミノ酸を1文字記号で示している。図中の数字はN末端を1位とした各アミノ酸の位置を示している。

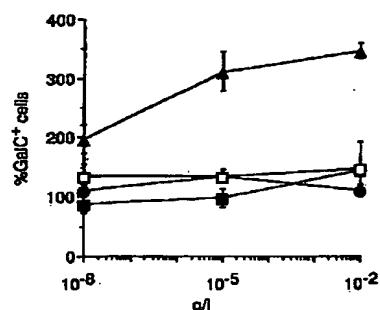
【図2】各合成オリゴペプチドのODC分化促進活性を

示す図である。■はPLP₄₀₋₅₀、●はPLP₂₀₉₋₂₁₇、▲はPLP₂₁₅₋₂₃₂、□はPLP₂₆₄₋₂₇₆を表す。横軸は合成オリゴペプチドの濃度、縦軸は1視野あたりの○1陽性(染色)細胞数である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶
A 61 K 38/00
// C 07 K 14/47

識別記号 ADD
ADN
ZNA

府内整理番号 F I
A 61 K 37/02

技術表示箇所
ABA
ADD
ADN